家蚕 BmN 细胞中 8 种启动子的活性比较及利用 hr5-IE1 启动子实现 EGFP 的稳定表达

王　娜，杜希宽，蒋明星*，张传溪，程家安
（浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310029）

摘要：为筛选出一个较强的启动子用于提高转座子 *piggyBac* 在家蚕 *Bombyx mori* 细胞中的转化效率，采用双荧光素酶报告基因检测(dual-luciferase reporter assay)技术比较了热激蛋白启动子(hsp70 和 hsp82)、家蚕肌动蛋白启动子(A3)、多聚泛素(polyubiquitin)启动子(PUB)、α 微管蛋白启动子(α-tub)、丝素轻链启动子(Fib-L)、人工合成启动子 3×P3 及苜蓿丫纹夜蛾多角体病毒(AcNPV)增强子-启动子组合(hr5-IE1)8 种启动子在家蚕细胞株 BmN 内的活性。结果显示 hr5-IE1 活性最强，A3 次之，其余启动子活性均较弱。构建含有 hr5-IE1 启动子和 *piggyBac* 的转座酶编码区的质粒作为辅助质粒，与 EGFP 载体质粒一起转染家蚕细胞后，实现了 EGFP 基因整合到细胞基因组中。因此，今后可考虑将 hr5-IE1 用于家蚕细胞遗传转化的研究中，以提高细胞转化的效率。

关键词：家蚕；hr5-IE1；荧光素酶分析；*piggyBac*；启动子；遗传转化
中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)03-0279-07

Comparison of transcriptional activities of eight promoters and application of hr5-IE1 promoter to realize the expression of EGFP in *Bombyx mori* BmN cells

WANG Na, DU Xi-Kuan, JIANG Ming-Xing*, ZHANG Chuan-Xi, CHENG Jia-An (Institute of Insect Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In order to find a strong promoter that can be used to promote expression of piggyBac transposase and thereby increase genetic transformation efficiency in cells of the silkworm, *Bombyx mori*, the transcriptional activities of eight promoters were compared in the BmN cells of *B. mori*, including hsp70, hsp82, actin3 (A3), polyubiquitin (PUB), α-tubulin, fibroin-L, artificial promoter 3×P3 and immediately early 1 gene promoter flanked by the hr5 enhancer element (hr5-IE1). The results showed that hr5-IE1 displayed the highest transcriptional activity, followed by A3, while the activities of the other six promoters were relatively low. When transfected with an EGFP vector and a *piggyBac* helper plasmid, in which the expression of piggyBac transposase was driven by hr5-IE1, the EGFP cassette was successfully integrated into the genome of BmN cells. Therefore, hr5-IE1 has the potential of serving as a sound element in future *piggyBac*-based transgenic research of *B. mori* with the capability of increasing transformation efficiency.

Key words: *Bombyx mori*; hr5-IE1; luciferase assay; *piggyBac*; promoter; genetic transformation

家蚕 *Bombyx mori* 作为一种重要的经济昆虫以及模式昆虫，近年对其遗传转化、瞬时表达系统的研究相当活跃，业已建立可用于基因功能研究、外源基因表达、通过 RNAi 使基因沉默等不同目的的各种系统，并且其中的一些核心技术，如家蚕胚胎显微注射技术，还在不断改进和优化之中(Goldsmith *et al.*, 2005；马三垣等，2009)。

在基于 *piggyBac* 等转座子的家蚕转基因研究中，人们多采用胞质肌动蛋白 Actin3(A3)、丝素 L 链(Fib-L)及人工合成的 3×P3 等启动子作为转基因或者转座酶基因的启动子(Tamura *et al.*, 2000；Wang *et al.*, 2000；Thomas *et al.*, 2002；李维等，2003；Imamura *et al.*, 2003, 2006；Tomita *et al.*, 2003；徐汉福等，2005；代红久等，2005；Adachi *et al.*, 2006；Uchino *et al.*, 2007, 2008；Zhong *et al.*, 2007)，少数研究也采用丝素 H 链(Kurihara *et al.*,

基金项目：国家重点基础研究发展规划项目(2009CB119200)
作者简介：王娜，女，1980 年 11 月生，河南鲁山人，博士，主要从事昆虫遗传转化和分子生物学研究，E-mail: nawang528@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: mxjiang@zju.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-10-26；接受日期 Accepted: 2010-02-18

2007)、丝素 fibrohexamerin(Royer *et al.*, 2005)、丝胶(Ogawa *et al.*, 2007; Tomita *et al.*, 2007)、天蚕素 CecB(Imamura *et al.*, 2006)、Hsp70(Uhlirova *et al*, 2002)或杆状病毒 IE2(Nakayama *et al.*, 2006)等启动子。这些研究中，显微注射家蚕早期卵后，当代转基因个体比例一般不到 5%(Tamura *et al.*, 2000; Uhlirova *et al.*, 2002; Royer *et al.*, 2005)，转基因系的 G1 代中转基因个体比例也不到 15%(Royer *et al.*, 2005; Tomita *et al.*, 2007; Uchino *et al.*, 2007)。可见，采用显微注射法得到的家蚕转基因效率还较低，有待提高(马三垣等, 2009)。其解决途径之一是，提高转座酶的瞬时表达水平以提高其催化能力，已证明这一方法对提高遗传转化效率十分有效(Kapetanaki *et al.*, 2002; Davidson *et al.*, 2003)。因此，在家蚕转基因研究中，选用什么样的启动子(及增强子、转录激活子等)，以尽可能提高辅助质粒中转座酶的表达水平，是值得考虑的。

已有相关研究中，王云等(2006)曾比较家蚕胞质肌动蛋白 Actin4(A4)、α 微管蛋白、丝素 H 链(Fib-H)和家蚕核型多角体病毒即刻早期蛋白(IE)这 4 种启动子调控红色荧光蛋白报告基因在家蚕细胞(Bm-e-HNU5)中的瞬时表达情况，发现 Fib-H 启动子活性相对较强，IE 次之，A4 最弱。近年来，家蚕中不断有新的启动子序列被克隆和分析，为挖掘可用于转基因研究的强启动子奠定了基础(彭云等, 2009; 谢敏等, 2009)。

最近，我们在筛选启动子用于另一家蚕细胞株(BmN)研究时，发现 Fib-L 启动子非常弱，而 A3 则较强；另一来自苜蓿丫纹夜蛾 *Autographa californica* (Speyer)核型多角体病毒(AcNPV)的启动子 IE1，虽不知其在 BmN 细胞中的活力，但发现它与增强子 hr5 一起时活性极强。表明在不同的细胞株中，同一类或同一种启动子的活性可能会有显著差异。现将这些结果报告如下，以期寻找在 BmN 细胞中具较强活性的启动子，用于提高 *piggyBac* 在细胞中的转化效率，为今后家蚕细胞遗传转化研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

pGL2-Basic, pGL2-Control, phRL-TK 等质粒载体购自 Promega 公司。质粒 phspBac, pαtubpiggyBac, pKhsp82, pB [pUB-nls-EGFP], pSL-3×P3-EGFPaf, pBac [3×P3-EGFPafm] 等由美国 Texas A&M 大学昆虫系 Craig J. Coates 博士馈赠，或经本实验室改造。*Escherichia coli* TG1 菌株由本实验室保存。家蚕 Nistari 品系由浙江大学特种经济动物科学系钟伯雄教授提供，家蚕细胞株 BmN 为张传溪教授实验室保存。TC-100 昆虫培养基购自 Sigma 公司，胎牛血清为 Gibco 公司产品，脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、质粒抽提试剂盒、荧光素酶检测试剂盒均为 Promega 公司产品。凝胶回收试剂盒为 Qiagen 公司产品。引物由上海生工生物公司合成。

1.2 家蚕基因组 DNA 的提取

家蚕(Nistari 品系)基因组 DNA 提取，方法参照 SDS-苯酚法提取高质量的棉铃虫 DNA(徐广等, 2000)，但略加改进。取家蚕幼虫，加入液氮研磨；加入 0.65 mL 裂解液(100 mmol Tris-HCl, pH 8.0; 25 mmol EDTA, pH 8.0; 500 mmol NaCl; 1.25% SDS)，迅速混匀，65℃ 水浴裂解 10 min；加入 1/2 体积 Tris 平衡过的苯酚，继续水浴保温 10 min，加入 1/2 体积氯仿：异戊醇(1∶1)，混匀，离心(12 000 r/min, 5 min)；取上清液，加入等体积苯酚：氯仿：异戊醇(25∶24∶1)抽提 2 次，离心(12 000 r/min, 3 min)，取上清液；将上清液加入 1.5 倍体积无水乙醇混匀。-20℃ 静置 30 min。倾去上清液，沉淀用 75% 乙醇漂洗，真空干燥，最后加入适量纯水溶解。

1.3 质粒构建

为了比较不同启动子在家蚕细胞中的强度，首先将各启动子片段插入到 pGL2-Basic 载体多克隆区域即荧光素酶 ORF 的上游，构建过程如下。

含家蚕肌动蛋白 A3 启动子的质粒 pGL2-A3：以 1.2 节获得的家蚕 DNA 为模板，Actin-F 5′-ATCTCGAGCGCGTTACCATATATG-3′和 Actin-R 5′-GCAGATCTCTTGAATTAGTCTGCAAG-3′为引物 PCR 扩增 A3 启动子。PCR 反应总体积 50 μL，内含 DNA 模板 2 μL, 10×PCR 缓冲液 5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 4 μL，两引物 10 μmol/L 各 1 μL, 10 mmol/L dNTP 1 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.4 μL，及 ddH_2O 35.6 μL。反应程序：94℃ 预变性 2 min；94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 1 min, 72℃ 延伸 1 min，共 30 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物克隆进 T-easy 载体后得到 pGEMT-A3；该质粒用 *Bgl* Ⅱ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切后，将其中的 A3 片段连入经相同酶切的 pGL2-

Basic 中，得到 pGL2-A3。

含丝素 L 链启动子的质粒 pGL2-FibL：以 1.2 节获得的家蚕 DNA 为模板，FibL5-F 5′-TCTCGAGGGTACGGTTCGTAAAGTT-3′ 和 FibL5-R 5′-CAGATCTTTTAGTGGTCTGTTAGTC-3′ 为引物，PCR 扩增启动子 fib-L 片段。PCR 反应体系和条件及随后的步骤同上述 pGL2-A3。

含 AcNPV 启动子和增强子的质粒 pGL2-hr5-IE1：用 *Sma* Ⅰ酶切质粒 pIE1-3 得到一个 AcNPV 启动子 IE1 及其上游增强子 hr5 的 1.14 kb 片段，将其连入也经 *Sma* Ⅰ 酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-hr5-IE1。

含 hsp70 启动子的质粒 pGL2-hsp70：以质粒 phspBac 为模板，hsp70F 5′-TAGAGCTC ATTCCCAT CCCCCTAGAATC-3′和 hsp70R 5′-CAAAGCTTCCCC AGAGTTCTCTTCTTGT-3′为引物，PCR 扩增果蝇 hsp70 启动子，克隆进 T-easy 载体后用 *Sac* Ⅰ 和 *Hin*dⅢ酶切得到 hsp70 片段，将其连入也经 *Sac* Ⅰ 和 *Hin*dⅢ酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-hsp70。

含 hsp82 启动子的质粒 pGL2-hsp82：用 *Sac* Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切质粒 pkhsp82 得到果蝇启动子 hsp82 片段，将其连入经 *Sac* Ⅰ 和 *Xho* Ⅰ 酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-hsp82。

含 α 微管蛋白启动子的质粒 pGL2-α-tub：质粒 pαtubpiggyBac 和 pBCSK + 分别用 *Not* Ⅰ和 *Eco*RV 双酶切，将从前者得到的 α-tub 片段连入后者中，得到 pBCα-tub；接着用 *Sac* Ⅰ和 *Hin*dⅢ酶切 pBCα-tub，将 α-tub 片段连入经相同酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-α-tub。

含多聚泛素（polyubiquitin）启动子的质粒 pGL2-PUB：质粒 pB［pUB-nls-EGFP］用 *Kpn* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切得到黑腹果蝇 *D. melanogaster* PUB 启动子片段，将其连入经 *Kpn* Ⅰ 和 *Bgl* Ⅱ 酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-PUB。

含人工合成启动子 3 × P3 的质粒 pGL2-3 × P3：质粒 pSL-3 × P3-EGFPaf 用 *Sal* Ⅰ 酶切后得到 3 × P3 片段，将其连入经 *Xho* Ⅰ 酶切的 pGL2-Basic 中，得到 pGL2-3 × P3。

1.4　细胞株 BmN 的培养

细胞用 TC-100 昆虫培养基 + 10% 胎牛血清于 28℃培养，待细胞密布于细胞液中时传代。

1.5　脂质体转染家蚕细胞

按照 Lipofectamine™ 2000 使用说明书进行。在 250 μL 无血清培养基中加入 4.0 μg DNA 混合物（含启动子质粒与内参 phRL-TK 质粒，两者比例为 1∶1），在另一 250 μL 无血清培养基中加入 10 μL Lipofectamine™2000，室温下放置 5 min 后将两溶液混合，轻轻混匀后室温下放置 20 min，然后将混合物（约 510 μL）加入到前一天分好 BmN 细胞的培养板中，前后晃动培养板使之混匀。28℃下培养 5 h 后更换含血清培养基，72 h 后收集细胞用于荧光素酶活性检测。转染 hsp70 或 hsp82 的细胞，收集前先置于 37℃ 热激 1 h。对每个启动子，均转染重复 3 次。每次转染均以 pGL2-Basic 为阴性对照。

1.6　荧光素酶活性检测

按照双荧光素酶报告基因检测系统［Dual-Luciferase Reporter（DLR™）Assay System］说明书进行。移去细胞培养板中的培养基，加入足够 PBS 洗两遍，每孔中加入 500 μL 1 × PLB，室温下混合震荡 15 min。在样品检测槽中加入 20 μL 混合好的细胞溶解液，在生物发光检测仪（Sirius 单管式化学发光检测仪）上检测荧光素酶活性（延迟 2 s，读数 10 s）。对每个启动子及对照，每次转染均测定 3 个重复。

生物发光检测仪每完成一次检测，系统会自动生成供试样品在不同时间的荧光素酶活性值（Excel 表）。对各启动子及对照质粒，先分别算得每次测定中的荧火虫荧光素酶（F）与海肾荧光素酶（R）的活性均值，计 F/R 比值，然后得到 3 次测定重复中的 F/R 均值；再根据公式 FA =（启动子 F/R 均值）/（对照 F/R 均值），得到各启动子的倍活性值（fold activity，FA）。3 次细胞转染和测定结束后，得到各启动子在各次转染重复中的 FA 值。

1.7　绿色荧光蛋白在家蚕细胞中的表达

目的是为了验证 hr5-IE1 启动子是否可提高转座酶的表达，进而提高外源基因向家蚕基因组的整合效率。

先构建含 hr5-IE1 的辅助质粒 pIE-piggyBac。方法是，以 phspBac 为模板，pBacSac Ⅱ：5′-CCGCGGATAAAATGGGTAGTTCTTTAGACGA-3′ 和 pBacBamH Ⅰ：5′-GGATCCTAATTAGCTTAAC TTAT ACA-3′为引物进行 PCR 扩增，产物克隆进 pGEM-T easy，经测序验证正确后，用 *Kpn* Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 酶切释放出 *piggyBac* ORF 片段，将其插入到 pBCSK + 的相同酶切位点，得到 pBC-*piggyBac*ORF；再用 *Sac* Ⅱ 和 *Bam*H Ⅰ 酶切 pBC-*piggyBac* ORF，将其 ORF 片段插入到 pIE1-3 的相同酶切位点，得到

pIE-piggyBac，具体方法参照 Mohammed 和 Coates (2004)。测序表明，其序列正确。

然后，将该质粒和供体质粒 pBac [3 × P3-EGFPafm] 采用脂质体介导法共转染家蚕细胞 BmN。在 250 μL 无血清培养基中加入 4.0 μg DNA (pBac [3 × P3-EGFPafm]:pIE-piggyBac = 1:1)混合物，在另一 250 μL 无血清培养基中加入 10 μL Lipofectamine™ 2000，室温下放置 5 min 后将两溶液混合，轻轻混匀后室温下放置 20 min，然后将混合物(约 510 μL)加入到前一天分好细胞的培养板中，前后晃动培养板使之混匀。28℃培养 5 h 后换含血清培养基，96 h 后于荧光倒置显微镜下观测荧光，待细胞密布后进行传代。

收集具 EGFP 表达的细胞，提取基因组 DNA，分别用 *Bam*H Ⅰ/*Not* Ⅰ，*Eco*R Ⅰ 和 *Sau*3A Ⅰ 酶切，以 750 bp 的 EGFP 片段作为探针进行 Southern 印迹，以无 EGFP 表达的细胞基因组 DNA 作为对照，分析 EGFP 基因是否确已插入到基因组中。

1.8 数据统计与分析

荧光素酶活性检测数据分析中以启动子种类作为自变量，各次转染中得到的 FA 值作为因变量，采用 SPSS 统计软件(SPSS Inc.，1999)对其进行单向方差分析。方差分析前，数据先进行 Log10 函数转换。采用 Tukey HSD 法比较启动子之间 FA 均值的差异显著性(取显著水平 $P = 0.01$)。根据各启动子 FA 均值大小，及其相互差异情况，评判和比较启动子活性的强弱。

2 结果与分析

2.1 含启动子质粒的构建

以 1.2 节方法所获得的家蚕基因组 DNA 为模板，Actin-F 和 Actin-R 为引物 PCR 扩增后，获得了一个约 0.66 kb 的 DNA 片段，Blastn 分析表明，其序列与已知的家蚕 A3 基因启动子序列(GenBank 登录号 U49854，AF422795)具 92% ~95% 的相似性。该片段含基因转录调控元件 SRE (serum response element)的序列 GCGCGTTACCATATATGG，对 A3 表达起重要作用的激活元件 ActE1(activator element 1)的序列 AGCCCGCGATTGGTGGAA(Mangé *et al.*，1997)，以及 TATA 盒，表明其确为家蚕 A3 的启动子序列。

以 FibL5-F 和 FibL5-R 为引物，PCR 扩增获得了一个约 0.64 kb 的 DNA 片段，其序列与已知的家蚕丝素 L 链启动子序列(AP009023，M76430，AF541967)具 98% ~99% 的相似性。该序列含 1 个与 Fib-L 转录密切相关的序列 GTCAATTT，及 1 个 TATA 盒，表明其确为家蚕 Fib-L 的启动子序列。

8 个启动子序列分别插入到 pGL2-Basic 荧光素酶报告基因的上游，经测序验证正确。

2.2 启动子活性比较

采用 DLR™评价法，测定和比较了各启动子在家蚕细胞 BmN 中的活性，结果见图 1。方差分析表明，细胞中荧光素酶倍活力 FA 与启动子种类显著相关($F = 65.663$，$df = 7$，$P < 0.001$)。FA 以 hr5-IE1 最大，达到了 1 280 左右，极显著高于其余启动子($P < 0.01$)。A3 次之，为 40 左右，极显著高于 fib-L，α-tub，PUB，hsp70，hsp82 和3 × P3($P < 0.01$)。可见，hr5-IE1 这一启动子和增强子组合在家蚕细胞中具很强的活性。

2.3 用 hr5-IE1 启动子实现外源基因 *EGFP* 向家蚕基因组的整合

用质粒 pBac [3 × P3-EGFPafm] 和 pIE-piggyBac 两者转染家蚕细胞，96 h 后可见具明显 EGFP 表达的细胞(图 2：A，B)，而对照中则未见表达(图 2：C，D)。Southern 印迹分析表明，具 EGFP 表达的细胞基因组出现明显的杂交条带，而对照则无条带(图 3)，表明 *EGFP* 确已插入到家蚕基因组中。

3 讨论

在 DLR™检测系统中，每一样品中的荧火虫荧光素酶和海肾荧光素酶两者是同时表达的，且同时测定其活性，因此，该法可最大限度地消除昆虫细胞、转染效率、细胞裂解效率、检测操作及仪器等因素可能带来的实验误差，使本实验的数据准确可靠。故我们基于此法得出的启动子活性比较结论，是可信的。

本研究中，hr5-IE1 在家蚕细胞中的活性显著高于其他启动子。相似结果，也发现于 Mohammed 和 Coates (2004) 对马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella* (Zeller)早期卵内启动子活性比较的报道中。hr5-IE1 中的增强子 hr5 为484 bp，由 6 个 26 ~30 bp 不完全回文序列组成，它是使 IE1 活性增强的重要因素。对 hr 的这种功能，Gray 和 Coates(2004)专门进行过考察，他们发现在白纹伊蚊 *Aedes albopictus*

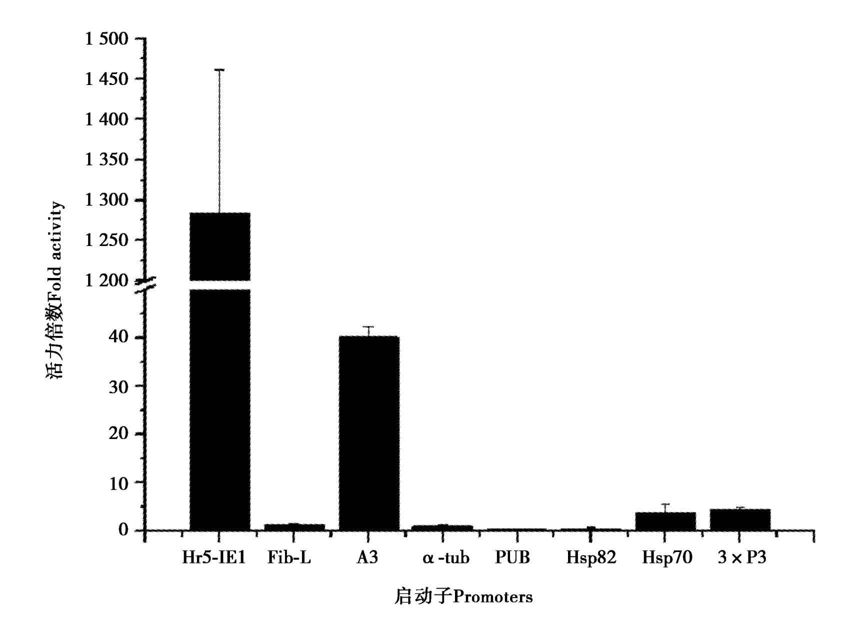


图 1　各启动子在家蚕 BmN 细胞中的活性强度比较

Fig. 1　Comparison of the transcriptional activities of eight promoters in *Bombyx mori* BmN cells

误差线表示活力倍数标准误 Error bars represent standard error.

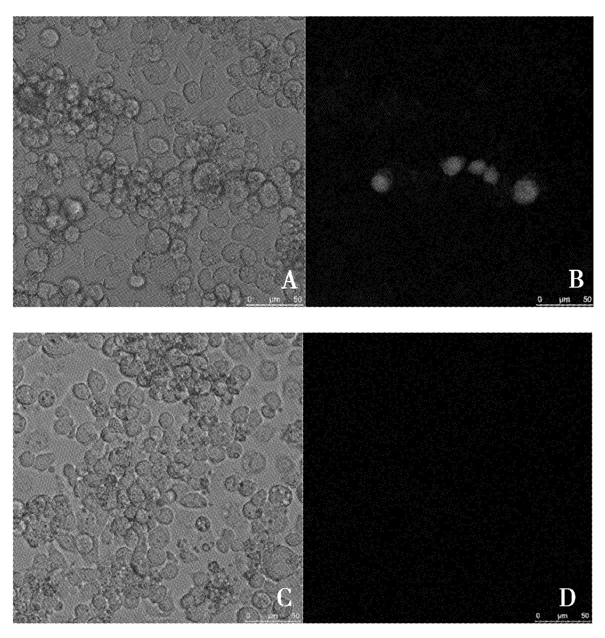


图 2　质粒 pBac［3×P3-EGFPafm］和 pIE-piggyBac 转染家蚕 BmN 细胞 96 h 后 EGFP 的表达情况

Fig. 2　Expression of EGFP in *Bombyx mori* BmN cells transfected with vectors pBac［3×P3-EGFPafm］and pIE-piggyBac

A：转染两种质粒，白光下观察 Transfected with the two plasmids and detected under white light；B：转染两种质粒，荧光下观察 Transfected with the two plasmids and detected under fluorescent light；C：仅转染 pBac［3×P3-EGFPafm］质粒，白光下观察 Transfected only with pBac［3×P3-EGFPafm］and detected under white light；D：仅转染 pBac［3×P3-EGFPafm］质粒，荧光下观察 Transfected only with pBac［3×P3-EGFPafm］and detected under fluorescent light.

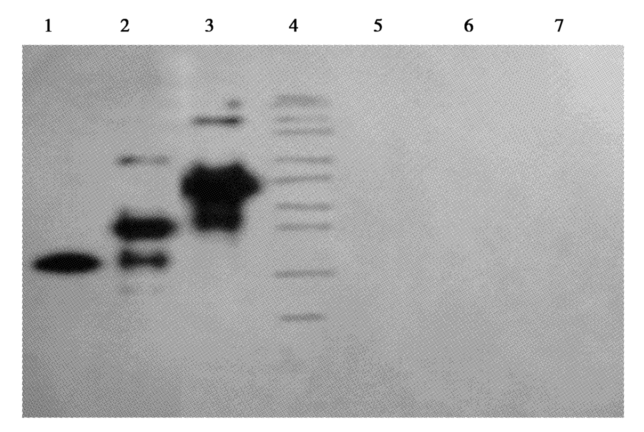


图 3　质粒 pBac［3×P3-EGFPafm］和 pIE-piggyBac 转染家蚕 BmN 细胞后基因组中插入 EGFP 基因片段的 Southern 印迹分析(探针为 750 bp 的 EGFP 基因片段)

Fig. 3　Southern blot analysis of EGFP integration in the genomic DNA of *Bombyx mori* BmN cells transfected with vectors pBac［3×P3-EGFPafm］and pIE-piggyBac (probed with a 750 bp EGFP fragment)

*Bam*HⅠ/*Not*Ⅰ酶切的转染细胞 Transformed cells, digested with *Bam*HⅠ/*Not*Ⅰ；2：*Eco*RⅠ酶切的转染细胞 Transformed cells, digested with *Eco*RⅠ；3：*Sau*3AⅠ酶切的转染细胞 Transformed cells, digested with *Sau*3AⅠ；4：Marker；5：*Bam*HⅠ/*Not*Ⅰ酶切的未转染细胞 Non-transformed cells, digested with *Bam*HⅠ/*Not*Ⅰ；6：*Eco*RⅠ酶切的未转染细胞 Non-transformed cells, digested with *Eco*RⅠ；7：*Sau*3AⅠ酶切的未转染细胞 Non-transformed cells, digested with *Sau*3AⅠ.

(Skuse)细胞中，Hr3 可使果蝇肌动蛋白 5C、果蝇 PUB 和 AcNPV-IE1 启动子的强度分别提高 4，22 和 47 倍。而在一澳大利亚铜绿蝇 *Lucilia cuprina* (Wiedemann) 中，hr5 的活性则极低(Heinrich *et al*., 2002)。可见，hr 因子的作用程度因启动子种类而异，还与昆虫种类(细胞株)有关，本研究对 hr5-IE1 在家蚕 BmN 这一细胞株中的活力进行考察，也是基于此考虑。不过，本研究仅考察了 hr5-IE1 在家蚕 BmN 这一个细胞株中的活性，它在其他家蚕细胞株中表现如何，有待另外考察。

对同一种启动子，在昆虫胚胎中表现强的，在昆虫细胞中有可能较弱，反之亦然。如，Huynh 和 Zieler(1999)发现，在白纹伊蚊细胞株 C6/46 中，果蝇 Actin5C 和 hr5-IE1 的活性要明显强于 hsp70，而在按蚊 *Anopheles* 胚胎中，hsp70 和 Actin5C 活性最高，hr5-IE1 则较弱。我们尚不清楚 hr5-IE1 在家蚕胚胎中的表现如何，不过，若利用家蚕细胞开展遗传转化或瞬时表达研究，可考虑选用 hr5-IE1，以提高转基因效率或表达水平。

致谢 感谢浙江大学特种经济动物科学系钟伯雄教授提供家蚕 Nistari 品系，浙江大学原子核农业科学研究所田兵博士为荧光素酶检测提供了帮助，浙江大学昆虫科学研究所田彩虹博士为细胞培养提供了帮助。

参 考 文 献 (References)

Adachi T, Tomita M, Shimizu K, Ogawa S, Yoshizato K, 2006. Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase α-subunits and human collagens in posterior silk glands: Production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *J. Biotechnol*., 126: 205 – 219.

Dai HJ, Xu GJ, Thomas JL, Wang ZG, Jiang RJ, Fei J, 2005. A stable and efficient method for silkworm transformation using lepidopteran-derived transposon *piggyBac*. *Chinese Science Bulletin*, 50: 1 470 – 1 474. [代红久, 徐国江, Thomas Jean-luc, 王铸钢, 蒋容静, 费俭, 2005. 利用鳞翅目来源的转座子 *piggyBac* 建立高效稳定的转基因家蚕技术. 科学通报, 50(14): 1 470 – 1 474]

Davidson AE, Balciunas D, Mohn D, Shaffer J, Hermanson S, Sivasubbu S, Cliff MP, Hackett PB, Ekker SP, 2003. Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the *Sleeping Beauty* transposon. *Develop. Biol*., 263: 191 – 202.

Goldsmith MR, Shimada T, Abe H, 2005. The genetics and genomics of the silkworm, *Bombyx mori*. *Ann. Rev. Entomol*., 50: 71 – 100.

Gray CE, Coates CJ, 2004. High-level gene expression in *Aedes albopictus* cells using a baculovirus Hr3 enhancer and IE1 transactivator. *BMC Mol. Biol*., 5: 8

Heinrich JC, Li X, Henry RA, Haack N, Stringfellow L, Heath A, Scott MJ, 2002. Germ-line transformation of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol*., 11: 1 – 10.

Huynh CQ, Zieler H, 1999. Construction of modular and versatile plasmid vectors for the high-level expression of single or multiple genes in insects and insect cell lines. *J. Mol. Biol*., 288: 13 – 20.

Imamura M, Nakahara Y, Kanda T, Tamura T, Taniai K, 2006. A transgenic silkworm expressing the immune-inducible cecropin B-GFP reporter gene. *Insect Biochem. Mol. Biol*., 36(5): 429 – 434.

Imamura M, Nakai J, Inoue S, Guo XQ, Kanda T, Tamura T, 2003. Targeted gene expression using the *GAL4/UAS* system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 165(3): 1 329 – 1 340.

Kapetanaki MG, Loukeris TG, Livadaras I, Savakis C, 2002. High frequencies of *Minos* transposon mobilization are obtained in insects by using *in vitro* synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucl. Acids Res*., 30: 3 333 – 3 340.

Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K, 2007. Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 355: 976 – 980.

Li W, Wang Y, Zhang SY, Zhu LQ, Huang M, Liu HF, 2003. Cloning of *Bombyx mori* cytoplasimic actin gene promoter and construction of *piggyBac* transposon expression vector. *J. Agric. Biotechnol*., 11(2): 173 – 178. [李维, 王宇, 张世英, 朱玲巧, 黄敏, 刘辉芬, 2003. 家蚕胞质肌动蛋白基因启动子的克隆及 piggyBac 转座子表达载体的构建. 农业生物技术学报, 11(2): 173 – 178]

Ma SY, Xu HF, Duan JP, Zhao AC, Zhang MR, Xia QY, 2009. Effect of several factors on the transformation efficiency in the transgenic technology of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin*., 52(6): 259 – 603. [马三垣, 徐汉福, 段建平, 赵爱春, 张美蓉, 夏庆友, 2009. 家蚕转基因技术中若干因素对转基因效率的影响. 昆虫学报, 52(6): 595 – 603]

Mangé A, Julien E, Prudhomme JC, Couble P, 1997. A strong inhibitory element down-regulates SRE-stimulated transcription of the A3 cytoplasmic actin gene of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol*., 265(3): 266 – 274.

Mohammed A, Coates CJ, 2004. Promoter and *piggyBac* activities within embryos of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae). *Gene*, 342(2): 293 – 301.

Nakayama G, Kawaguchi Y, Koga K, Kusakabe T, 2006. Site-specific gene integration in cultured silkworm cells mediated by φC31 integrase. *Mol. Genet. Genomics*, 275: 1 – 8.

Ogawa S, Tomita M, Shimizu K, Yoshizato K, 2007. Generation of a transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon: Production of recombinant human serum albumin. *J. Biotechnol*., 128: 531 – 544.

Peng Y, Pan YW, Qian YY, Zheng QY, Jiang L, Cao GL, Xue RY, Gong CL, 2009. Transiently secretory expression of DsRed driven by sericin promoter with the signal peptide sequence of fibroin chain of *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin*., 52(11): 1 177 – 1 182. [彭云, 潘远旺, 钱琰琰, 郑清银, 姜岚, 曹广力, 薛仁宇, 贡成良, 2009. 带有丝素重链信号态序列的家蚕丝胶蛋白启动子

驱动DsRed的瞬时分泌表达. 昆虫学报, 52(11): 1 177－1 182]

Royer C, Jalabert A, Da Rocha M, Grenier AM, Maucham PB, Couble P, Chavancy G, 2005. Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Res.*, 14(4): 463－472.

SPSS Inc., 1999. SPSS Base 9.0 Applications Guide. Chicago, Illinois.

Tamura T, Thibert C, Royer C, Kanda T, Abraham E, Kamba M, Komoto N, Thomas JL, Maucham PB, Chavancy G, Shirk P, Fraser M, Prudhomme JC, Couble P, 2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*, 18: 81－84.

Thomas JL, Da Rocha M, Besse A, Maucham PB, Chavancy G, 2002. 3×P3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 247－253.

Tomita M, Hino R, Ogawa S, Iizuka M, Adachi M, Shimizu K, Sotoshiro H, Yoshizato K, 2007. A germline transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon. *Transgenic Res.*, 16: 449－465.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K, 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type Ⅲ procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.*, 21: 52－56.

Uchino K, Imamura M, Shimizu K, Kanda T, Tamura T, 2007. Germ line transformation of the silkworm, *Bombyx mori*, using the transposable element. *Minos. Mol. Genet. Genomics*, 277: 213－220.

Uchino K, Sezutsu H, Imamura M, Kobayashi I, Tatematsu KI, Iizuka T, Yonemura N, Mita K, Tamura T, 2008. Construction of a *piggyBac*-based enhancer trap system for the analysis of gene function in silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1 165－1 173.

Uhlirova M, Asahina M, Riddiford LM, Jindra M, 2002. Heat-inducible transgenic expression in the silkmoth *Bombyx mori*. *Dev. Genes Evol.*, 212(3): 145－151.

Wang W, Swevers L, Iatrou K, 2000. Mariner (Mos1) transposase and genomic integration of foreign gene sequences in *Bombyx mori* cells. *Insect Mol. Biol.*, 9(2): 145－155.

Wang Y, Ye XQ, Wu YL, Gui MY, Zuo ZH, 2006. Comparison of four promoters for transient expression of *RFP* reporter gene in cultured *Bombyx mori* cells (Bm-e-HNU5). *Acta Entomol. Sin.*, 49(2): 167－171. [王云，叶向群，吴亦亮，桂慕燕，左正宏，2006. 四种启动子调控*RFP*报告基因在家蚕细胞(Bm-e-HNU5)内的瞬时表达. 昆虫学报, 49(2): 167－171]

Xie M, Gong CL, Xue RY, Sheng J, Zhang XR, Li YM, Yu XH, Cao GL, 2009. Cloning of silkworm hsp20.4 promoter and effects of EGT expression driven by the promoter on pupal development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 52(3): 246－253. [谢敏，贡成良，薛仁宇，盛洁，张晓荣，李艳梅，虞晓华，曹广力，2009 家蚕hsp20.4启动子克隆及其驱动表达产物EGT对家蚕蛹体发育的影响. 昆虫学报, 52(3): 246－253]

Xu G, Guo YY, Liang GM, Zhang J, 2000. Isolation of cotton bollworm genomic DNA by the improved SDS-phenol method. *Chin. Bull. Entomol.*, 37(3): 177－178. [徐广，郭予元，梁革梅，张杰，2000. SDS-苯酚法提取高质量的棉铃虫DNA. 昆虫知识, 37(3): 177－178]

Xu HF, Xia QY, Liu C, Wu XF, Yang YP, Zhao P, Xiang ZH, 2005. Construction and expression of the transgenic vector pBacA3EG in the silkworm *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 48(5): 799－803. [徐汉福，夏庆友，刘春，吴雪峰，杨远萍，赵萍，向仲怀，2005. 家蚕转基因载体pBacA3EG的构建及其表达. 昆虫学报, 48(5): 799－803]

Zhong BX, Li JY, Chen JE, Ye J, Yu SD, 2007. Comparison of transformation efficiency of *piggyBac* transposon among three different silkworm *Bombyx mori* strains. *Acta Bioch. Bioph. Sin.*, 39(2): 117－122.

(责任编辑：赵利辉)